

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月29日 (29.03.2001)

PCT

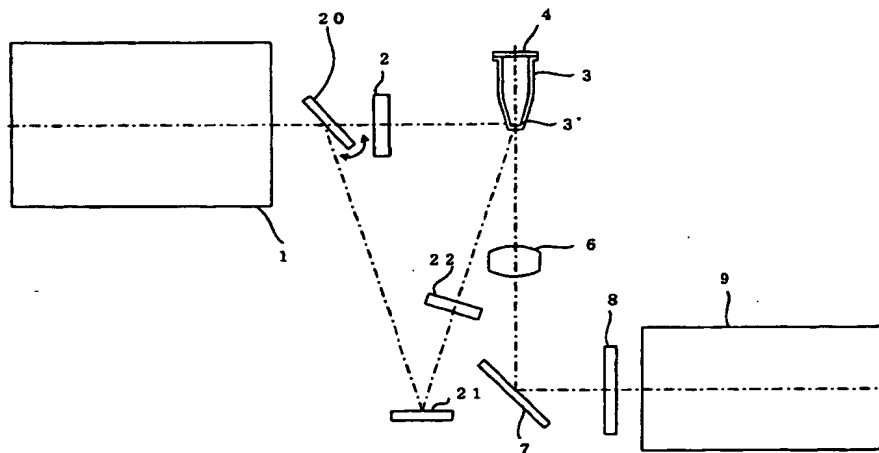
(10) 国際公開番号
WO 01/22064 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 21/64, 33/49 (YABUSAKI, Katsumi) [JP/JP]. 石川宗晴 (ISHIKAWA, Muneharu) [JP/JP]. 廣野泰亮 (HIRONO, Taisuke) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1-25-5 興和株式会社 興和総合科学研究所内 Ibaraki (JP). 新野雅夫 (NIINO, Masao) [JP/JP]. 松井宏樹 (MATSUI, Hiroki) [JP/JP]; 〒443-0041 愛知県蒲郡市宮成町13番35号 興和株式会社 電機光学事業部 蒲郡工場内 Aichi (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06342
- (22) 国際出願日: 2000年9月18日 (18.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/263145 1999年9月17日 (17.09.1999) JP
- (74) 代理人: 弁理士 加藤 卓 (KATO, Takashi); 〒162-0845 東京都新宿区市谷本村町2番11号 外濠スカビル5階 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 興和株式会社 (KOWA KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒460-8625 愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号 Aichi (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, CN, IL, KR, SG, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藪崎克己
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: FLUORESCENT PARTICLE IMAGING DEVICE

(54) 発明の名称: 蛍光粒子撮像装置



(57) Abstract: An imaging container (3) for containing fluorescent particles dyed with a fluorescent dye collectively at the bottom is provided. If the container contains a substance having a high transmittance to exciting light such as a blood platelet derivative or a diluted blood red cell derivative, a mirror (20) is removed from the optical path, and only the bottom and the portion near the bottom of the container are irradiated from side with the exciting light. Even if the solution in the container contains a fluorescent dye, the fluorescence is prevented from acting as disturbing light. If the container contains a substance having a low transmittance to exciting light such as a high-concentration blood red cell derivative, the mirror (20) is placed in the optical path, and the bottom of the container is irradiated from below. In this case, since the transmittance is low, the exciting light reaches only the bottom and the portion near the bottom, and fluorescence acting as background light is hardly produced. Even if the transmittance to the exciting light is different, illumination corresponding to the transmittance can be selected, and therefore the fluorescent particles can be counted correctly.

[続葉有]

WO 01/22064 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

蛍光色素で染色した蛍光粒子を底部に集積させて収容する撮像用容器（3）が設けられる。血小板製剤あるいは希釈された赤血球製剤などのように励起光の透過率が高いものが容器に入っている場合には、ミラー（20）を光路から離脱させて、励起光で容器の底部近傍のみを側面から照射する。蛍光色素が容器内の溶液中にあってもこれが有害光となるのを防止できる。高濃度の赤血球製剤などのように励起光の透過率が低いものに対しては、ミラー（20）を光路に挿入して容器底部を底面側から照射する。その場合、透過率が低いために励起光は底部近傍にしか到達できず、バックグラウンド光としての蛍光はほとんど発生しない。励起光の透過率が異なってもそれに応じた照明を選択できるので、蛍光粒子数を正確に計数できる。

明 細 書

蛍光粒子撮像装置

技術分野

本発明は、蛍光粒子撮像装置、更に詳細には、蛍光色素により染色
5 された白血球などの蛍光粒子を撮像する蛍光粒子撮像装置に関する。

背景技術

従来、医療の分野で血液から血小板及び赤血球を抽出した血小板製剤
及び赤血球製剤が製造されている。この血小板製剤及び赤血球製剤はい
ずれも輸血に供されるものであり、その中に混入している白血球は好ま
10 しいものではない。そのために上記製剤において白血球の混入数を知る
ことが重要になる。従来は、ナジェットチャンバーと呼ばれるスライド
ガラスプレートに染色色素によって染色されたサンプル血小板製剤を
入れ照明光を照射し顕微鏡にて白血球の数をかぞえている。具体的には、
50 μ リットルをとり、この中の白血球数をかぞえることで全バッグ中
15 の白血球数に換算している。この作業は慣れた人が時間をかけて行なわ
なければならず、極めて非能率的で疲れるものであった。

これらの作業を能率的に行なう装置として、特開平11-18338
2号公報に開示されているような蛍光粒子撮像装置がある。この装置で
は、蛍光色素で染色した蛍光粒子（白血球）が撮像用容器の底部に集積
20 されて収容されており、励起光により撮像用容器の底部近傍のみが照明
されて、蛍光粒子が励起されている。そして、撮像用容器の底部が底面
側から撮像されて、蛍光粒子が計数されている。

ここで開示された手段では、血小板製剤、血漿製剤、髄液などのよう
に励起光の透過率が高いものでは非常に有用である。また、赤血球製剤
25 では、遠心作用により、赤血球と白血球を分離しているが除去率は1割

程度で多量の白血球が混入する。その場合には赤血球製剤を希釈して微量のサンプル中の白血球数を減らして数をかぞえ、希釈倍率を考慮して全バッグ内の白血球数に換算している。この場合には赤血球製剤であっても励起光の透過率は高く開示された発明は有用である。

- 5 しかるに、白血球混入数の少ない赤血球製剤では希釈する必要がないため、励起光の透過率が低く底部に集積した白血球に均一に励起光が照射されず正確な数をかぞえることが困難である。

従って、本発明は、被測定物の励起光に対する透過率が異なっているにもかかわらず正確に蛍光粒子数を計測することが可能な蛍光粒子撮像装置を提供
10 することをその目的としている。

発明の開示

本発明では、上記目的を達成するために、蛍光色素で染色した蛍光粒子を撮像する撮像装置において、蛍光粒子を底部に集積させて収容する撮像用容器と、蛍光粒子を励起させる励起光を発生する手段と、励起
15 光で撮像用容器の底部近傍のみを側面から照明する第1の照明手段と、励起光で撮像用容器の底部を底面側から照明する第2の照明手段と、第1と第2の照明手段を切り替える切替手段と、第1あるいは第2の照明手段で照明される撮像用容器の底部を底面側から撮像する撮像手段とを有する構成を採用している。

20 血小板製剤あるいは希釈された赤血球製剤などのように励起光の透過率が高いものが容器に入っている場合には、蛍光粒子が集積している部分以外を照射すると、そこにも蛍光色素が存在するためそれがバックグラウンド光となって撮像された画像のコントラストを劣化させるため、容器の底部近傍のみを側面から照射するのが好ましい。

25 一方、希釈されない高濃度の赤血球製剤などのように励起光の透過率

が低いものに対して側面から照射すると、励起光の入射する側では蛍光が得られるが、反対側まで励起光が到達できず十分な蛍光を得ることが困難になるので、容器底部を底面側から照射するのが望ましい。その場合、透過率が低いために励起光は底部近傍にしか到達できず、バックグ

5 ラウンド光としての蛍光はほとんど発生することはない。

そこで、本発明では、照明手段を切り替えることにより、励起光の透過率の高いものに対しては、励起光で容器の底部近傍のみを側面から照射し、一方励起光の透過率が低いものに対しては容器の底部を底面側から照明するようにしている。従って、被測定物の励起光に対する透過率
10 が異なってもそれに応じた最適な照明手段を選択でき、正確に蛍光粒子数を計数することが可能になる。

図面の簡単な説明

第1図は、蛍光粒子撮像装置の概略構成を示す構成図であり、第2図は、撮像された蛍光粒子の像を解析並びに表示する装置を示した正面図
15 である。

発明を実施するための最良の形態

以下、図面に示す実施の形態に基づき本発明を詳細に説明する。

第1図と第2図には、本発明の一実施形態が図示されており、符号1で示すものは、レーザ光源で、例えば緑色の波長のレーザビームを発生
20 するYAGレーザが用いられる。このレーザ光源1からのレーザビームの光路には、不図示の切り替え機構により光路に挿脱可能な切替ミラー20が配置される。レーザ光源1からのレーザビームは、切替ミラー20が光路から離脱されているときは、拡散機能を有する部材、例えばスリガラス等で形成される拡散板2に入射して拡散され、上部がカバー4
25 で覆われた撮像用容器3の底部3'を側面から照射する。この撮像用容

器 3 の底部には蛍光粒子が集積しており、蛍光粒子がレーザビームで照射され蛍光を発するようになる。レーザビームで照射された蛍光粒子の像は、対物レンズ 6 を経てミラー 7 で反射され、バリアフィルタ 8 で所定帯域の帯域光が通過され、CCD カメラ 9 で撮像される。

- 5 また、切替ミラー 20 が図示したように、光路に挿入されているときは、レーザ光源 1 からの励起光は切替ミラー 20 並びにミラー 21 を介して反射され、拡散板 2 と同様な拡散板 22 で拡散された後、容器 3 の底部を底面側から照射する。レーザビームで照射された蛍光粒子の像は、同様に対物レンズ 6 を経てミラー 7 で反射され、バリアフィルタ 8 で所定帯域の帯域光が通過され、CCD カメラ 9 で撮像される。
- 10

- CCD カメラ 9 で撮像された蛍光粒子の像は、第 2 図に示すように、信号線 10 を介してコンピュータ 12 のビデオキャプチャ 11 でコンピュータに取り込まれ、画像処理回路 13 で画像処理されて、蛍光粒子が認識される。この認識は、蛍光粒子のところでは輝度に変化するので、
- 15 例えば、信号値を微分することにより蛍光粒子の座標位置を検出して行なうことができる。認識された蛍光粒子は、モニタ 14 に表示される。第 2 図には、容器の底部の像 15 並びにその中の複数の蛍光粒子 15 a がモニタ 14 に表示されている状態が図示されている。また、この蛍光粒子 15 a の数が計数され、その計数値がモニタ 14 の下方部 16 にも
- 20 表示される。

- 撮像用容器 3 は、透明なポリスチレン樹脂、ガラス、アクリル樹脂、特に好ましくは、ポリスチレン樹脂で一体成型される。撮像用容器 3 には、例えば、血小板製剤、あるいは希釈されたあるいは希釈されない赤血球製剤などが入れられる。また、撮像用容器 3 には、血小板および白
- 25 血球の細胞質を分解する薬液（トライトン X（商品名））が入れられ、

さらに白血球の細胞核を染色する蛍光色素（プロピディウムイオダイド）が入れられ、次に、遠心分離機（不図示）によって白血球の核が容器 3 の底部に沈められる。所定の G をかけるとすべての白血球核は撮像用容器 3 の底部 3' に集積するようになる。

5 このような構成において、撮像用容器 3 に、血小板製剤あるいは 10 0 倍程度に希釈された赤血球製剤のように励起光の透過率の高いものが入れられている場合には、切替ミラー 20 を光路から離脱させ、レーザ光源 1 を点灯して、撮像用容器 3 の底部近傍のみを励起光で側面から照射する。撮像用容器 3 の底部には蛍光色素で染色された白血球が集積
10 しており、染色された白血球の核は、入射したレーザビームで励起されると、600 nm 付近の蛍光を発する。これを容器下部から対物レンズ 6、ミラー 7、バリアフィルタ 8 を介して CCD カメラ 9 で撮像する。なお、バリアフィルタ 8 で蛍光波長の帯域光のみを透過させるので、有害波長光をカットすることができる。

15 レーザビームは、蛍光粒子の集積している容器底部だけを照明し、その底部に集積している白血球を側面から効果的に照明しているので、蛍光色素がなお容器 3 内の溶液中に浮遊していても、これがバックグラウンドとして有害光となるのを防止でき、撮像された画像のコントラストを向上させることができる。CCD カメラ 9 で撮像された蛍光粒子の像
20 は、第 2 図に示すように、信号線 10 を介してコンピュータ 12 のビデオキャプチャ 11 でコンピュータに取り込まれ、画像処理回路 13 で画像処理されて、白血球 15 a の数が正確に計数される。なお、容器の底部近傍のみを照射するために、それ以外の部分を遮蔽する遮蔽部材を容器の周囲に設けると、さらに好ましい結果が得られる。

25 一方、撮像用容器 3 に、希釈されない濃度の高い赤血球製剤が入れら

れているときは、切替ミラー 20 を光路に挿入し、レーザ光源 1 からの励起光をミラー 21 で上方に反射させ、励起光で撮像用容器 3 の底部を底面側から照射する。これにより容器の底部に集積した白血球は蛍光を発するので、側面照射のときと同様に、白血球の数が蛍光粒子の数として計数される。なお、励起光は赤血球製剤により吸収され、赤血球製剤に対して透過率が低くなるため、励起光は底面側から入射されても、底部近傍にしか到達できず、バックグラウンド光としての蛍光はほとんど発生しないので、コントラストの高い画像が得られ、同様に、白血球の数を正確に計数できるようになる。

- 10 なお、上述した実施形態では、一個のレーザ光源からのビームを、切替ミラーにより切り替え、容器の底部を側面から照射したり、あるいは底面側から照射している。これに代えて、側面照射用のレーザ光源と、底面照射用のレーザ光源を個別に設け、容器の底部を側面から照射する場合には、そのためのレーザ光源を点灯し、あるいは底面側から照射する
- 15 場合には、そのためのレーザ光源を点灯するようにしてもよい。あるいは両レーザ光源を点灯しておいて、側面照射か、底面照射かに応じて、いずれかのレーザビームをシャッタ等で遮断していずれかの照射に切り替えるようにすることも可能である。

産業上の利用可能性

- 20 以上の説明から明らかなように、本発明では、励起光の透過率の高いものに対しては、励起光で容器の底部近傍のみを側面から照射し、一方励起光の透過率が低いものに対しては容器底部を底面側から照射するようにしているので、被測定物の励起光に対する透過率が異なってもそれに応じた最適な照明が得られ、蛍光粒子数を正確に計数することが可能になる。
- 25

請 求 の 範 囲

1. 蛍光色素で染色した蛍光粒子を撮像する撮像装置において、
蛍光粒子を底部に集積させて収容する撮像用容器と、
蛍光粒子を励起させる励起光を発生する手段と、

5 励起光で撮像用容器の底部近傍のみを側面から照明する第1の照明
手段と、

励起光で撮像用容器の底部を底面側から照明する第2の照明手段と、
第1と第2の照明手段を切り替える切替手段と、

第1あるいは第2の照明手段で照明される撮像用容器の底部を底面
10 側から撮像する撮像手段と、

を有することを特徴とする蛍光粒子撮像装置。

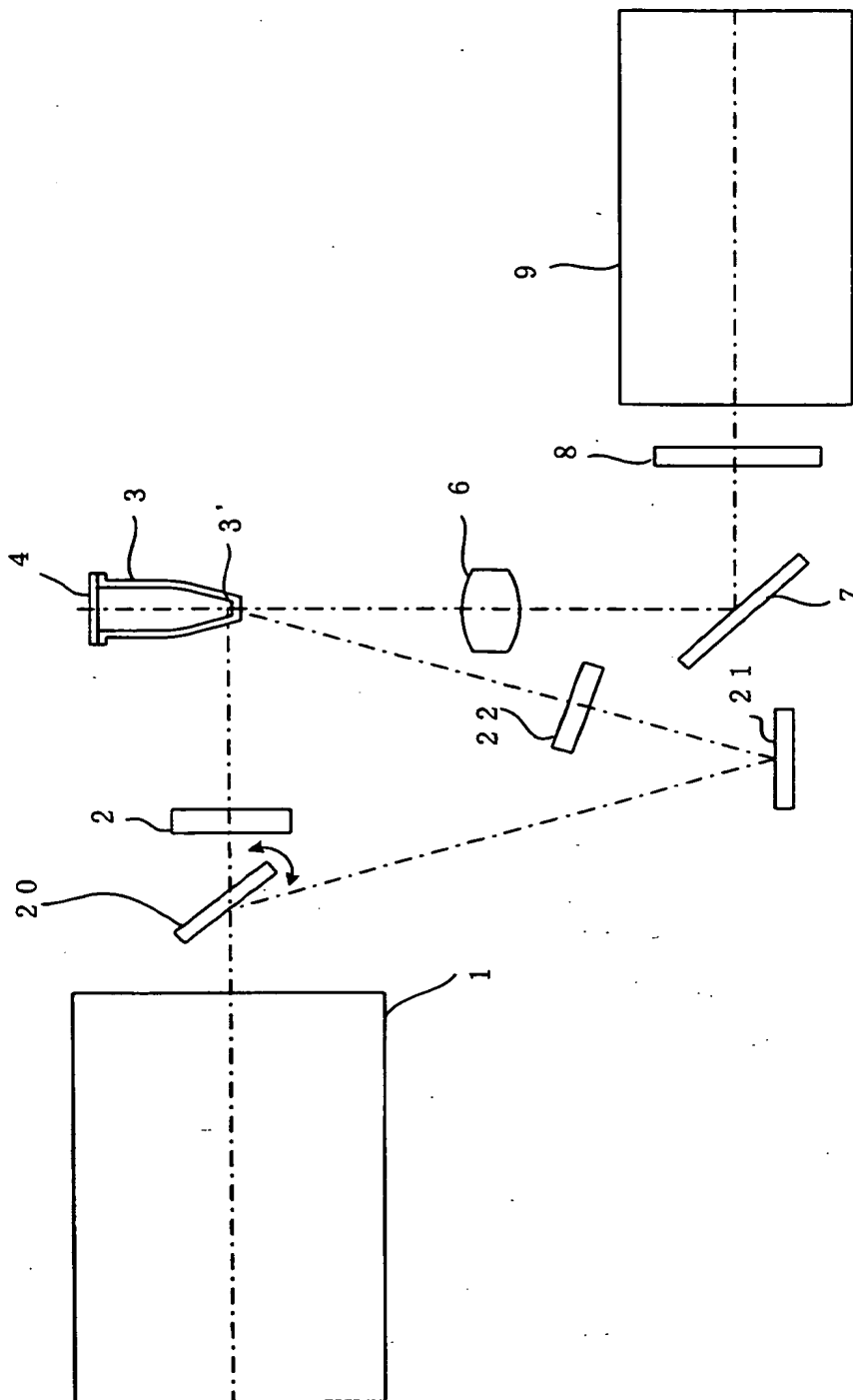
2. 前記切替手段が、第1の切替位置にあるときは、励起光を撮像用
容器の底部側面に導き、第2の切替位置にあるときは、励起光を撮像用
容器の底面に導く光学素子であることを特徴とする請求の範囲第1項
15 に記載の蛍光粒子撮像装置。

3. 撮像用容器の底部側面照明用の励起光源と、撮像用容器の底面照
明用の励起光源を設け、切替手段によりいずれか一方の励起光源からの
励起光に切り替えることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の蛍光
粒子撮像装置。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

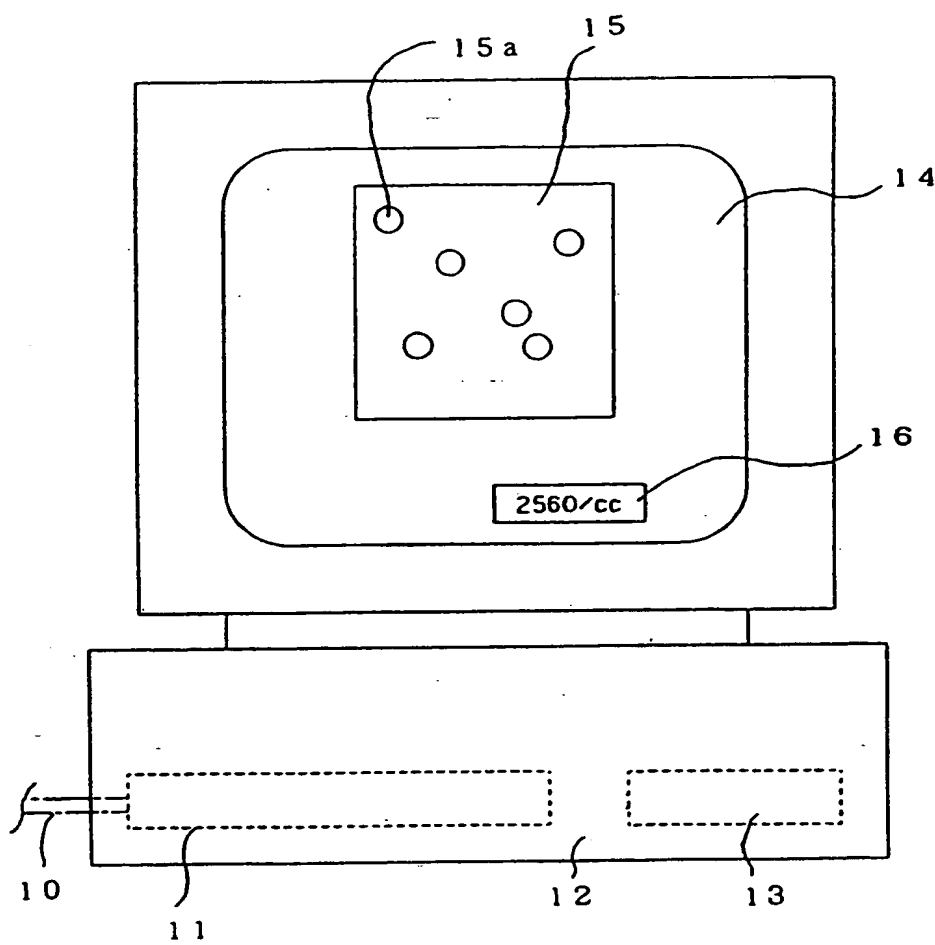
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第1図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第2図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06342

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁷ G01N21/64
Int. Cl.⁷ G01N33/49

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁷ G01N21/62-21/74
Int. Cl.⁷ G01N15/00-15/14
Int. Cl.⁷ G01N33/48-33/49

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JOIS
WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 11-183358, A (KOWA COMPANY, LTD), 09 July, 1999 (09.07.99), Full text; Figs. 1 to 10 & EP, 926483, A	1-3
A	JP, 09-281036, A (Seitai Hikari Joho Kenkyusho K.K.), 31 October, 1997 (31.10.97), Full text; Fig. 4 (Family: none)	1-3
A	JP, 01-167664, A (Hitachi, Ltd.), 03 July, 1989 (03.07.89), Full text; Fig. 1 (Family: none)	1-3



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 November, 2000 (09.11.00)

Date of mailing of the international search report
21 November, 2000 (21.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N21/64Int. Cl⁷ G01N33/49

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N21/62-21/74Int. Cl⁷ G01N15/00-15/14Int. Cl⁷ G01N33/48-33/49

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2000年

日本国登録実用新案公報 1994-2000年

日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JOIS

WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 11-183358, A (興和株式会社) 9.7月.1999(09.07.99) 全文, 第1-10図 & EP, 926483, A	1-3
A	J P, 09-281036, A (株式会社生体光情報研究所) 31.10月.1997(31.10.97) 全文, 第4図 ファミリーなし	1-3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.11.00

国際調査報告の発送日

21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 俊光

2W

9706

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 01-167664, A (株式会社日立製作所) 3.7月.1989(03.07.89) 全文, 第1図 ファミリーなし	1-3